

Producció de biomassa del fong *Trametes versicolor* en un reactor de tanc agitat

Miquel Palou

Directora: Teresa Viscent

Tutora: Paqui Blaquez

Projecte final de carrera
de ciències Ambientals



Universitat Autònoma
de Barcelona

Agraïments

Durant aquest any ple d'aventures, molta gent m'ha ajudat a realitzar aquest projecte, i m'han ensenyat TANT que mai els hi podré agrair prou. Per això, tot i saber que mai podré pagar el meu deute, m'agradaria fer-els hi un racó en l'inici del meu projecte.

Primer de tot agrair-li a la Paqui la seva confiança en mi des del inici fins al final de l'aventura. Moltes gràcies Paqui.

Després agrair a la Teresa el seu optimisme i la capacitat que té de contagiar-lo, moltes gràcies perquè el que fa dos mesos semblava impossible ara és real.

També agrair al Guillem, la Lucia, al Marcel i la Marina per fer que un pop en un laboratori pogués passar per un inexpert investigador.

En general agrair el suport i consells de tot el grup de tòxics de la UAB.

Finalment moltes gràcies a la Bertux per fer que els pals a les rodes fossin menys durs i fàcils de trencar.

"L'èxit és aprendre a anar de fracàs en fracàs"

Winston Churchill

"He fallat un i altre cop en la meva vida, per això he aconseguit l'èxit"

Michael Jordan

Índex

Agraïments	1
Índex	3
Índex de taules i figures	5
Índex d'imatges.....	6
1. Introducció	8
1.1 Bioremediació	8
1.1.1 Tipus de bioremediació	10
1.1.2 Micoremediació.....	12
1.1.3 Enzims.....	13
1.2 <i>Trametes versicolor</i>	14
2. Objectius.....	17
2.1 Antecedents.....	17
3. Materials i mètodes	19
3.1 Materials.....	19
3.1.1 Microorganisme	19
3.1.2 Medi de creixement.....	19
3.1.3 Colorant Gris Lanaset G.....	19
3.1.4 Orange G.....	19
3.1.5 Methilene Blue	20
3.1.6 Medi de decoloració en placa	20
3.1.7 Materials per colonització en biopila	20
3.1.8 Bioreactor.....	21
3.2 Mètodes.....	22
3.2.1 Producció de biomassa de <i>Trametes versicolor</i> en bioreactor.....	22
3.2.2 Decoloració en placa.....	22
3.2.3 Experiment en biopila	22
3.3 Mètodes Analítics	23
3.3.1 Determinació de la biomassa	23
3.3.2 Determinació d'activitat enzimàtica lacasa en medi líquid.....	23
3.3.3 Determinació d'activitat enzimàtica lacasa en medi sòlid	23

4. Resultats i Discussió	25
4.1 Producció de biomassa.....	25
4.2 Viabilitat del fong produït.....	27
4.2.1 Proves de viabilitat en placa amb colorants.....	27
4.2.2 Proves de viabilitat en llots de depuradora	34
5. Conclusions.....	39
6. Bibliografia	40
Annex I	44
Fitxa de seguretat d'Orange G.....	44
Fitxa de seguretat Mthilene Blue.....	50
Fitxa seguretat de Gris lanaset G.....	57
Annex II	66
Distribució de les etapes de realització del projecte	66
Annex III	67

Índex de taules i figures

Taula 1. Avantatges i desavantatges de la bioremediació.....	12
Taula 2. Composició del medi MEG.....	20
Taula 3. Biomassa i activitat enzimàtica produïda en els dos reactors	25
Taula 4. Creixement de <i>T.versicolor</i> en les plaques amb colorant.....	32
Taula 5. Producció de lacasa per <i>T.versicolor</i> en diferents substrats lignocel·lulòsics.....	35
Taula 6. Producció de lacasa per <i>T.versicolor</i> en la colonització de llots de depuradora.....	36
Figura 1. Bioreactor de tanc agitat.....	21
Figura 2. Evolució del pH durant la producció de <i>Trametes versicolor</i>	26
Figura 3. Creixement de <i>T.versicolor</i> en Orange G.....	32
Figura 4. Creixement de <i>T.versicolor</i> en Methylene Blue	33
Figura 5. Creixement de <i>T.versicolor</i> en Gris lanaset G.....	33

Índex d'imatges

Imatge 1. <i>Trametes versicolor</i>	14
Imatge 2. Inoculació de <i>T.versicolor</i> produït en el bioreactor 2 (temps 0). D'esquerra a dreta: Orange G, Methilene Blue i Gris Lanaset G.....	27
Imatge 3. Creixement de <i>Trametes versicolor</i> al cap de 3 dies de ser inoculat a les plaques.....	28
Imatge 4. Creixement de <i>Trametes versicolor</i> al cap de 6 dies de ser inoculat a les plaques.....	29
Imatge 5. Creixement de <i>Trametes versicolor</i> al cap de 16 dies de ser inoculat a les plaques.....	30
Imatge 6. Creixement de <i>Trametes versicolor</i> al cap de 28 dies de ser inoculat a les plaques.....	31
Imatge 7. Pinso per a conills colonitzat per <i>T.versicolor</i>	34
Imatge 8. Branques d'olivera triturades colonitzades per <i>T.versicolor</i>	34
Imatge 9. Llots de depuradora colonitzats per <i>T.versicolor</i>	35

Introducció

1. Introducció

Des de temps immemorials l'esser humà ha utilitzat altres essers vius com a eina per dur a terme activitats impossibles o molt costoses per a ell. A més a més, un cop l'home es va adonar del benefici que obtenia gràcies a les capacitats d'altres essers vius, va fomentar la proliferació d'aquests. Aquest projecte s'ha centrat en la producció de biomassa del fong *Trametes versicolor* per a què pugui dur a terme funcions de bioremediació.

1.1 Bioremediació

El desenvolupament tecnològic sofert en èpoques anteriors ha deixat en herència un medi ambient malmès. Un dels principals factors de deteriorament és la contaminació produïda per la mobilització de substàncies ja existents (petroli i metalls pesants, entre d'altres) cap a medis que no els són propis i que no els poden immobilitzar. Una altra font de contaminació han estat els productes químics de nova síntesi, tals com combustibles, plaguicides, fàrmacs i detergents, entre d'altres.

Cada medi té la capacitat d'assumir una certa quantitat de contaminants, una mala gestió d'aquests per part nostra ha provocat que els contaminants es trobin en concentracions massa elevades perquè a través de processos naturals espontanis (físics, químics o biològics) es pugui solucionar el problema. La bioremediació ajuda a que a través d'agents biològics en un medi contaminat es degradin els contaminants d'origen orgànic o s'extreguin els d'origen inorgànic. Per aquest procés es fan servir microorganismes, plantes o els seus enzims per a tornar al medi ambient alterat la condició original. Hi ha dos vies principals per les quals un contaminant pot ser modificat, la via metabòlica on s'utilitza el contaminant com a font de carboni o energia, en la qual actuen majoritàriament enzims intracel·lulars. I la via cometabòlica on es transforma de forma fortuïta el contaminant per enzims produïts pel microorganisme en presència d'un substrat de creixement. El contaminant no

es utilitzat com a font de carboni ni energia i els enzims habitualment són extracel·lulars.

A partir de la dècada dels 60, a Califòrnia, es va començar a desenvolupar una tecnologia que utilitzava microorganismes per degradar petroli, aquets van ser els inicis de la bioremediació. Cap als anys 80 ja s'utilitzaven microorganismes per degradar un gran ventall de contaminants. És important remarcar que la bioremediació neix d'una necessitat: descontaminar zones, emplaçaments i materials que anteriorment no tenien un valor econòmic però que ara interessa recuperar.

Es pot definir la bioremediació en termes generals com: La utilització de la capacitat de biodegradació de microorganismes i plantes per descontaminar el medi (Rittmann i McCarty, 2000). Actualment el medi on més s'aplica la bioremediació és en sòls contaminats, ja que el sòl és una font de matèria orgànica i altres nutrients que permet la supervivència dels agents biològics encarregats de la descontaminació. Un altre medi on es pot aplicar la bioremediació és en fangs de depuradora. Aquets poden ser utilitzats per a diversos usos, el ús majoritari és (un 86% del llots de depuradora de Catalunya) com a adob per a l'agricultura després de passar per un tractament d'assecat i d'estabilització (Alcañiz et al., 2008). L'adob produït per els llots de depuradora és de baixa qualitat, degut a que molts contaminants en el procés de depuració de l'aigua passen a la fase solida o precipiten i són arrossegats amb els llots. Alguns dels contaminants que poden presentar-se són contaminants orgànics i metalls pesants en concentracions considerables, i excés de N i P, entre d'altres (Benítez et al., 2000; Balanyà et al., 2002; Ojeda, 2005). Hi ha una sèrie de contaminants orgànics que es recomana controlar, concretament: hidrocarburs aromàtics policíclics (PAH), bifenils policlorats (PCB), alquilbenzenosulfonats lineals (LAS) i alquilbenzens lineals (LAB), ftalats (en concret el dietil-hexil ftalat, DEHP), nonil-fenols etoxilats (NPE) i dioxines i furans, tot i que malauradament, no és obligatori determinar-ne el contingut en els fangs (REAL DECRETO 1310/1990) (BOE 166, DE 12-07-01). Per reduir les concentracions d'aquets contaminants es poden afegir microorganismes que els degradin i així, obtenir un adob de millor qualitat.

Aquest procés es pot dur a terme mitjançant biopiles, un tractament de residus en fase sòlida copiant el compostatge encara que l'objectiu no és obtenir compost.

1.1.1 Tipus de bioremediació

- Bioremediació intrínseca: es limita a un seguiment de la descontaminació que es dona de forma natural com a conseqüència de l'activitat metabòlica dels microorganismes que hi han, de forma natural i espontània, en el sòl.
- Bioestimulació: consisteix en afavorir el creixement i l'activitat metabòlica de les poblacions microbianes que, de forma natural, es troben en el sòl a tractar. Per tant, el que es busca és augmentar la taxa de degradació mitjançant el control dels paràmetres fisicoquímics del sòl, tals com l'oxigen dissolt i la disponibilitat de nutrients.
- Bioaugmentació: es basa en la inoculació al sòl de microorganismes que prèviament s'ha demostrat la seva capacitat per degradar els contaminants presents en el sòl. Aquesta tècnica s'utilitza quan les poblacions microbianes presents en el sòl no poden degradar els contaminants i per tant no és factible portar a terme una bioestimulació. En aquest cas, cal tindre present que els microorganismes que s'inocularan s'han fet créixer en condicions controlades en un laboratori i, un cop inoculats, es trobaran en un escenari de competència amb els microorganismes autòctons, els quals estan més ben adaptats al medi en qüestió.

Pel que fa a l'emplaçament, la bioremediació es pot realitzar *in situ* o *ex situ*.

- Bioremediació *in situ*: quan es porta a terme en el mateix emplaçament, sense moviment de grans masses de sòl. En aquest cas, els inòculs i tots els agents bioestimulants s'hauran de fer arribar fins a les zones del sòl afectades. Això pot ser un

inconvenient, a més a més de no poder-se controlar tots els factors ambientals necessaris, però té un cost econòmic inferior a la bioremediació *ex situ*. Un exemple de tractament in situ és:

Bioventing: és una tecnologia que utilitza microorganismes externs per degradar contaminants orgànics adsorbits pel sòl en la zona no saturada. En el bioventing, l'activitat dels microorganismes introduïts es veu reforçada per un flux d'aire entrant, i si cal, per l'addició de nutrients, que es fan passar per la zona no saturada del sòl mitjançant pous d'extracció o injecció d'aire. Aquest sistema és molt eficaç en la degradació de contaminants orgànics volàtils.

Biosparging: és una tècnica similar al Bioventing però el gas s'injecta a la fase saturada del sòl i en cabals majors. Permet la descontaminació d'aqüífers i combinat amb el Bioventing es pot aconseguir una descontaminació global de tot el subsòl.

Biobarreres permeables: Es col·loquen barreres de materials porosos que travessen el corrent de l'aigua del subsòl. Els microorganismes hi creixen i degraden el contaminant del aqüífer.

- Bioremediació *ex situ*: quan es porta a terme en un altre emplaçament, en una instal·lació específica o és mouen grans masses de sòl. Hi han tres tipologies diferents:

Landfarming: es disposa el sòl a tractar sobre un sòl no contaminat i es llaura.

Biopiles: També anomenades biocel·les, es construeix una pila de sòl o material a descontaminar on a través de processos biològics els contaminants són biodegradats i/o mineralitzats. Segons el requeriments del microorganismes, s'insereixen els nutrients necessaris per donar l'estructura bàsica al microorganisme, i així, poder colonitzar el material a descontaminar, que també pot constituir una font de matèria orgànica rica en micro i macro nutrients.

Tipus de biopiles:

Biopila estàtica: es subministren els inòculs, bioestimulants, aigua

i aire a través d'una xarxa de tubs.

Biopila dinàmica: es subministren els inòculs, bioestimulants i aigua, i periòdicament es volteja la pila.

En la següent taula es mostren les avantatges i desavantatges de la bioremediació:

Taula 2. Avantatges i desavantatges de la bioremediació

Avantatges	Desavantatges
Sostenible	Depèn de la biodegradabilitat del component tòxic
En cas de mineralització es produeixen residus naturals i no tòxics	Pot requerir nutrients i/o oxigen extra
<i>In situ</i> no hi ha transport	Els microorganismes es poden veure afectat per les condicions ambientals
Revegetació natural	Llarg temps de tractament en comparació al tractament fisicoquímic
No és necessari un seguiment a llarg termini	
Baix cost econòmic	

1.1.2 Micoremediació

Els fongs són un grup heterogeni de microorganismes eucariotes repartits per tot el medi ambient, degut a que poden sobreviure en gairebé tots els habitats. Gran part dels fongs estan constituïts per unes estructures anomenades micelis, que es divideixen en micelis vegetatius (encarregats del transport i absorció de nutrients) i micelis reproductors (creixen cap a la superfície del medi i formen les estructures reproductives) (Singh, 2006). En condicions òptimes, els micelis reproductors donen lloc a espores, la germinació de les quals dóna lloc a unes noves estructures anomenades hifes.

Les hifes són estructures cilíndriques constituïdes per un conjunt successiu de cèl·lules amb una paret cel·lular formada per quitina. La majoria de les hifes dels fongs són septades, però poden presentar porus que permetin el pas del

citoplasma i els orgànuls i la migració dels nuclis cap a diferents parts del miceli (Singh, 2006). La hifa formada per l'espore (hifa mare) es començarà a ramificar quan les condicions del medi siguin favorables, donant lloc a noves hifes ramificades. Els agregats d'aquestes noves hifes són el que es coneix amb el nom de miceli.

- Els fongs ligninolítics:

Els fongs ligninolítics són basidiomicets que poden mineralitzar i despolimeritzar la lignina en condicions aeròbies, gràcies al seu sistema enzimàtic extracel·lular. Aquests tipus de fongs són dels pocs organismes ligninolítics de la natura.

1.1.3 Enzims

El sistema enzimàtic és el principal mitjà pel qual els fongs poden degradar macromolècules insolubles en molècules més petites i solubles que poden ser fàcilment assimilades per altres microorganismes (Wallenstein i Weintraub, 2008). Els enzims que produeixen els fongs per degradar macromolècules poden ser utilitzats paral·lelament per degradar contaminants.

Els enzims modificadors de lignina són oxidoreductases, els quals poden ser peroxidases (manganès peroxidasa i lignin peroxidasa) i fenoloxidases (lacasa).

- Manganès peroxidasa: (MnP) és un enzim extracel·lular secretat per una part dels fongs de podridura blanca. És una glicoproteïna glicosilada que utilitza l'H₂O₂ per oxidar el Mn²⁺ a Mn³⁺ quelat. Les seves expectatives en bioremediació recauen en el fet de poder actuar com un oxidant no específic en substrats fenòlics (Cullen i Kersten, 2006).
- Lignin peroxidasa: (LiP) va ser la primera peroxidasa en ser associada a la deslignificació de la fusta pel fong *Phanerochaete chrysosporium* per Kirk i Yang (1979). La LiP catalitza l'oxidació dels compostos no fenòlics segrestant un electró de les cadenes laterals de la lignina per formar radicals lliures. La MnP i la LiP estan involucrades en el procés de degradació de la lignina (Katagiri i col., 1995), tot i que alguns estudis insinuen que la LiP per si sola també és capaç de degradar la lignina

(Banci i col. 1999), estudis més recents han demostrat que la degradació de la lignina és més efectiva quan actua la MnP alliberant fragments de lignina que, posteriorment, seran modificats per la LiP (Webster i Weber, 2007) per donar lloc a molècules solubles.

- Lacasa: (Lac) és un dels enzims extracel·lular més investigats per a l'aplicació industrial. La lacasa forma part del grup anomenat *blue multicopper oxidases* i es pot trobar com a enzim intra o extracel·lular, cada molècula conté quatre àtoms de coure distribuïts en diferents llocs d'enllaç, i té l'habilitat de reduir l'oxigen molecular a aigua (Harvey i Thurston, 2001). Les lacases poden oxidar àcids fenòlics i metoxifenòlics, els quals també poden ser descarboxilats. Al igual que les peroxidases, la lacasa és inespecífica pel substrat i la seva acció no es veu alterada pel monòxid de carboni.

1.2 *Trametes versicolor*

Trametes versicolor és un fong anomenat popularment “cua de gall d'indi” que habita sobre troncs morts i en provoca la podridura blanca, anomenada així degut al color que queda a la fusta després del pas del fong, ja que gràcies als enzims que produeix (manganès peroxidasa i lacasa) pot degradar la lignina de la fusta.



Imatge 2. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor, en la natura, té forma de ventall que pot arribar a mesurar 10 cm i amb uns tons beixos que canvien segons la genètica i el medi en que es troba el fong, tal com mostra la imatge 1. Tot i que es pot trobar tot l'any, la època en que és més fàcil de veure és cap a la tardor, ja que és l'època en que allibera les espores. En canvi, en condicions de laboratori *Trametes versicolor* pot créixer de forma dispersa (miceli) o de forma compacta (pèl·let). Generalment els treballs amb cultius submergits amb el fong es fan en forma de pèl·let.

El tipus de morfologia que s'obté durant el creixement del fong depèn de les condicions en que aquest creix. Així la font de carboni, la relació C/N, el pH, la força iònica del medi, el nivell d'inòcul, l'aeració, el tipus i la velocitat d'agitació i recentment descobert la saturació d'oxigen en el medi (Borràs i col. 2008), són determinants en el procés i la morfologia de creixement.

El pH òptim del medi per *Trametes versicolor* és de 4,5 i la seva temperatura òptima és de 25°C. En el procés de creixement el fong pot produir lacasa que degut al seu efecte oxidant provoca l'acidificació del medi en un ambient natural. Aquest fenomen, al fong li podria servir de mecanisme de defensa per mantenir el medi que l'envolta en un pH àcid.

Trametes versicolor està sent investigat en molts laboratoris del món, ja que produeix una sèrie d'enzims molt útils per al tractament de certs residus i/o contaminants, per exemple: hidrocarburs policíclics aromàtics (PHA) (Majcherczyk i col. 1998), una gran varietat de colorants (Blánquez i col., 2004; Casas i col., 2007; Casas i col. submitted 2012) i també fàrmacs com el ibuprofen, diclofenac, carbamazepina, etc. (Marco-Urrea i col., 2010; Rodriguez-Rodriguez i col., 2011).

Objectius

2. Objectius

L'objectiu del treball és produir biomassa de *Trametes versicolor* en condicions que s'aproximin a escala industrial, mitjançant un sol pas des de cultiu en placa a reactor de tanc agitat per produir miceli.

Un cop produït el miceli es comprova la viabilitat del fong mitjançant dos tipus d'experiments:

- Decoloració en placa.
- Colonització de llots d'EDAR en biopila.

2.1 Antecedents

Per assolir aquests objectius es parteix de l'expertesa del grup de recerca Biorem UAB que cultiven el fong a escala laboratori a través de varies etapes:

- Cultiu en placa.
- Producció de miceli en erlenmeyer.
- Producció de pel·let en erlenmeyer i bioreactor.

La producció de pel·lets a partir de miceli s'ha realitzat també en reactor fluïditzat per aproximar-se a condicions industrials.

Materials i mètodes

3. Materials i mètodes

3.1 Materials

3.1.1 Microorganisme

Trametes versicolor (ATCC#42530). Es manté a 25°C en plaques de Petri de 9 cm de diàmetre en medi d'agar (1.5%) amb un 2% d'extracte de malta (Sharlau ref.07-080500). Les plaques es ressempren mensualment.

3.1.2 Medi de creixement

El medi de creixement del fong conté extracte de malta amb una concentració de 20 g/l. L'extracte de malta utilitzat és de la casa comercial Scharlau ref.07-080500. El medi s'ajusta a pH 4,5 amb àcid clorhídric 1M i s'esterilitza a 120°C durant 30 min.

3.1.3 Colorant Gris Lanaset G

El colorant tèxtil Gris Lanaset G és àmpliament utilitzat en els processos de tenyit, ja sigui sol o combinat amb altres colorants. Aquest colorant és comercialitzat per Ciba (ref. 080173.5) i està format per una barreja de colorants metàl·lics complexes, l'estructura i composició del qual no és de coneixement públic. El colorant Gris Lanaset G no és un producte tòxic tal com mostra la fitxa de seguretat d'aquest producte que es presenta a l'Annex 1, on es detallen també altres característiques de la seva composició.

3.1.4 Orange G

El colorant Orange G és àmpliament utilitzat en histologia per electroforesis i rastreig d'àcids nucleics. Aquest colorant es comercialitza per Sigma-Aldrich (ref. O3756), la seva fórmula molecular és $C_{16}H_{10}N_2O_7S_2Na_2$. El colorant Orange G tot i no estar classificat com un producte perillós pot ser tòxic per a certs animals, tal i com mostra la fitxa de seguretat del producte que es presenta a l'Annex 1, on es detallen també les seves característiques i la seva composició.

3.1.5 Methilene Blue

El colorant Methilene Blue és bastament utilitzat en molts camps diferents des de investigació química i biològica fins a medicina utilitzat coma placebo, passant per aqüicultura i un llarg etc... Aquest colorant es comercialitza per Sigma-Aldrich (ref. M9140), la seva fórmula molecular és $C_{16}H_{18}N_3SCl$. El Methilene Blue pot provocar irritació als ulls, la pell i les vies respiratòries i la seva ingestió és nociva, tal com indica la fitxa de seguretat del producte adjunta en l'Annex 1, on es detallen també les seves característiques i la seva composició.

3.1.6 Medi de decoloració en placa

La viabilitat de la biomassa obtinguda en el bioreactor es determina mitjançant la mesura del creixement del fong en plaques de Petri de 9 cm de diàmetre amb medi MEG i amb colorants. A la taula 2 es mostra la composició del medi MEG:

Taula 2. Composició del medi MEG

Extracte de malta	0,5 %
Agar	2 %
Glucosa	1 %
Colorants	150 ppm
pH	4,5

Els colorants que s'han utilitzat són: Gris Lanaset G, Orange G i Methilene Blue.

3.1.7 Materials per colonització en biopila

Els substrats utilitzats com a material de suport per la colonització de *Trametes versicolor* han estat, pinso per a conills, i branques d'olivera .

El residu utilitzat ha estat llots de la depuradora del Prat de Llobregat assecats tèrmicament.

3.1.8 Bioreactor

En aquest treball s'utilitza un bioreactor agitat mecànicament de 5 L de volum útil. El bioreactor està compost per un cos central cilíndric encamisat que permet mantenir la temperatura estable a l'interior (figura 2).

La coberta superior consta de 3 vàlvules, on dues s'utilitzen per l'entrada i sortida d'aire i la tercera roman tancada, la coberta també disposa de 4 orificis. L'orifici central és on es col·loca l'eix de l'agitador de pales, en un dels altres orificis es col·loca la sonda de pH i en un tercer orifici hi ha la presa de mostra mentre que el quart queda tancat.

L'agitador està compost per un motor on es poden fixar les revolucions per minut i una pala amb forma d'ancora que permet l'agitació completa del medi.

La temperatura s'ha mantingut constant a 25°C mitjançant aigua que prové d'un criòstat i circula per la camisa del reactor. S'ha introduït aire a una pressió constant d'1 atm, i que prèviament a ser introduït al reactor s'humidifica fent-lo passar per un humidificador.

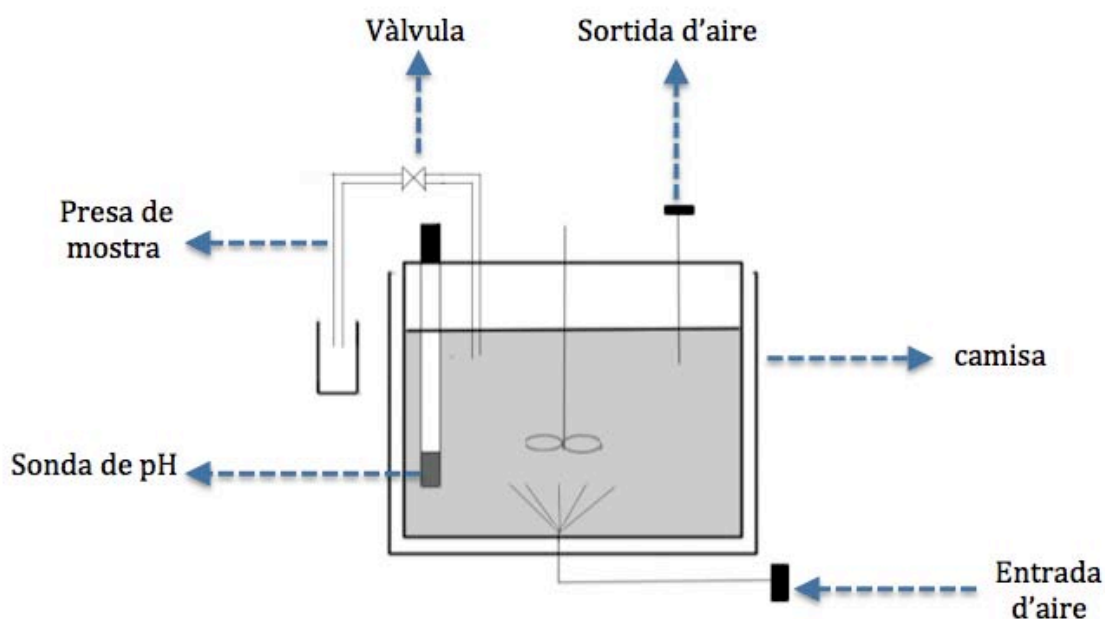


Figura 1. Bioreactor de tanc agitat

3.2 Mètodes

3.2.1 Producció de biomassa de *Trametes versicolor* en bioreactor

Per la realització dels experiments en discontinu de producció de biomassa en un reactor de tanc agitat, es segueix la següent metodologia de posada en marxa del sistema:

- Preparació del medi de creixement.
- Esterilització tèrmica del reactor i del medi de creixement. Durant 30 min a 121 °C.
- Inoculació a partir d'una placa d'agar tallada en cubs, d'un metre quadrat d'àrea aproximadament, del fong *Trametes versicolor*.

3.2.2 Decoloració en placa

Es col·loca al centre de la placa, amb material prèviament esterilitzat a 120°C durant 30 min, una petita porció del fong obtingut en el bioreactor, es sella per evitar l'entrada de contaminants o altres organismes que puguin interferir, seguidament s'incuba a 25°C i es mesura diàriament el diàmetre la zona decolorada.

3.2.3 Experiment en biopila

Es simula un tractament de depuració de llots d'EDAR en biopila utilitzant tubs de pyrex de 100x24 mm en unes condicions d'un 60% d'humitat a 25°C. El tractament consta de dos etapes, en la primera etapa el fong colonitza el substrat (pinso per a conills o branques d'olivera), i en la segona el fong colonitza els llots i en degrada el contaminant

Es preparen quatre grups de tubs de pyrex amb entre 3g i 4g en pes sec de cada substrat, per quadruplicat. Tots els tubs han estat autoclavats dos cops a 121°C durant 30 min (Borràs i col. 2011). Posteriorment, es procedeix, en condicions estèrils, a humitejar els substrats amb aigua destil·lada estèril fins assolir el 60% d'humitat i a la inoculació de 0,02 g de pes sec de *T.versicolor*. Seguidament, els cultius s'incuben a 25°C. Transcorreguts entre 7 i 10 dies que es mostreja la mescla per determinar la producció de lacasa en el procés de

colonització del substrat. Un cop mostrejats, s'afegeixen 6 g de llots de depuradora prèviament autoclavats a 121°C durant 30 min i s'addiciona aigua destil·lada per mantenir la humitat al 60%. Al cap de 15 dies es determina la producció de lacasa. Durant els 15 dies que dura l'experiment es volteja periòdicament la biopila per airejar-la.

3.3 Mètodes Analítics

3.3.1 Determinació de la biomassa

La biomassa es determina com a pes sec segons descriu el mètode 250 D de l'Standard Methods for the examination of water and wastewater (APHA, 1995).

3.3.2 Determinació d'activitat enzimàtica lacasa en medi líquid

L'activitat enzimàtica es mesura mitjançant la versió modificada del mètode per a la determinació del manganès peroxidasa (Kaal i col., 1993). El medi de reacció conté: 200 µL de malonat sòdic 250 mM a pH 4.5, 50µL de 2,6dimetoxifenol (DMP) 20 mM i 600 µL de mostra. El DMP és oxidat per la lacasa inclús en absència de cofactors. Es mesura durant dos minuts la variació de l'absorbància a 468 nm i 30°C en un espectrofotòmetre Varian Cary 3 UV/Vis equipat amb termòstat. Les unitats d'activitat (U) es defineixen com el número de micromols de DMP oxidats per minut (µmol DMP/min). El coeficient d'extinció del DMP és de 24800 M⁻¹ cm⁻¹ (Wariishi i col. 1992)

3.3.3 Determinació d'activitat enzimàtica lacasa en medi sòlid

L'enzim lacasa s'extreu d'acord amb el mètode modificat de Lang i col. (1998): s'addicionen 30 mL de tampó d'acetat de sodi (0.16M, pH 5) a 3 g de mostra homogeneïtzada i s'agita durant 30 min a 4°C. Es prenen 1.5 mL dels extractes i es centrifuguen a 15 000 g durant 15 min. A continuació, s'analitza el sobrenedant. L'activitat enzimàtica es mesurar tal i com s'ha descrit en l'apartat anterior.

Resultats i discussió

4. Resultats i Discussió

En aquest apartat es presenten i es discuteixen els resultat més importants obtinguts en els experiments realitzats durant el projecte. Les proves realitzades es divideixen en dos fases diferents:

- La primera fase es basa en la producció de *Trametes versicolor* en un reactor de tanc agitat en discontinu i la quantificació de la biomassa produïda.
- En la segona fase s'analitza la viabilitat de la biomassa produïda i la capacitat de colonització del fong en llots de depuradora utilitzant dos substrats diferents com a material de suport.

4.1 Producció de biomassa

La primera fase es porta a terme inoculant el fong *Trametes versicolor* crescut en placa, en un reactor amb medi de creixement d'extracte de malta ajustat a pH 4,5.

Es realitzen diversos experiments, en la taula 3 es mostren els resultats de dos d'ells considerats representatius. Durant la realització del projecte es mesura la biomassa produïda en el bioreactor i també l'enzim lacasa.

Taula 3. Biomassa i activitat enzimàtica produïda en els dos reactors

	Reactor 1	Reactor 2
Biomassa (pes sec)	6, 05 g/l	7,01 g/l
Acivitat lacasa	193.2 U/l	51.2 U/l

Com s'observa a la taula 3, en el reactor 1 es produeix una mica menys de biomassa que en el reactor 2, però en canvi es produeix més enzim. L'enzim només s'analitza com a indicador de l'activitat del fong ja que la composició del medi no és la òptima per la producció d'enzim degut a que és un medi de

creixement.

Les diferències de producció de biomassa obtingudes en els dos reactors no són significatives, els reactors es comporten de manera semblant com també es pot observar en la evolució del pH al llarg del temps que es mostra a la figura 2.

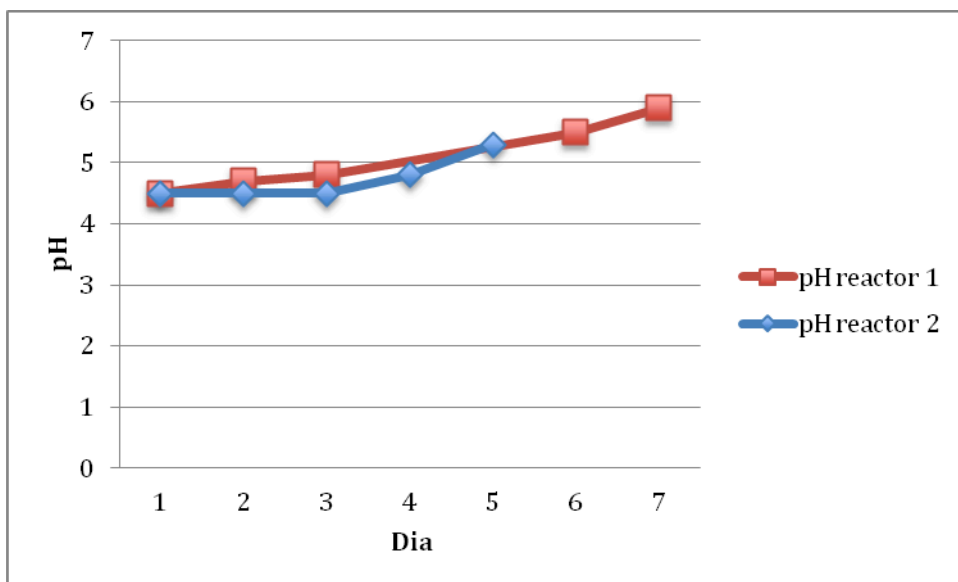


Figura 2. Evolució del pH durant la producció de *Trametes versicolor*

Com es pot observar, el pH augmenta al llarg del temps encara que de forma poc pronunciada. Segons s'ha descrit per diversos autors el pH òptim de producció de lacasa pel fong està entre 4 i 5,5. Si es parteix d'un medi amb el pH en aquest rang i no es tampona o es controla per a mantenir-lo, quan comença la producció de lacasa juntament amb àcids que també produeix el fong, el pH del medi s'acidifica. En aquest cas, com la producció enzimàtica es baixa, i el medi no està tamponat, el pH augmenta.

També es vol fer notar que a partir del tercer dia de cultiu s'observa contaminació del medi. Si es volgués evitar aquesta contaminació caldria portar a terme l'experiment en altres condicions (reactor estanc) o mantenir el pH en condicions àcides per evitar el creixement d'altres microorganismes. De tota manera, encara que el cultiu es contamina i s'observi creixement bacterià, l'objectiu és avaluar si en la segona fase la biomassa produïda és viable i es pot utilitzar per tractar un efluent real.

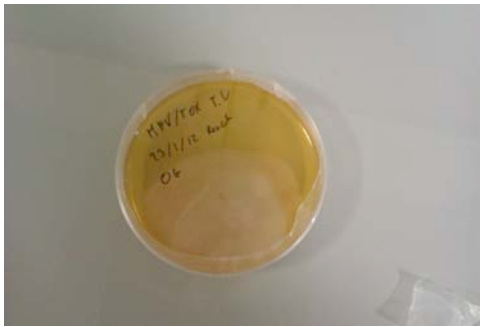
4.2 Viabilitat del fong produït

4.2.1 Proves de viabilitat en placa amb colorants

Un cop s'ha produït biomassa, aquesta es sembra en plaques de petri amb un medi d'extracte de malta (20%) i diferents colorants (150ppm). Els colorants utilitzats han estat Gris Lanaset G, Orange G i Methilene Blue. S'han escollit aquests colorants perquè s'ha publicat amb anterioritat que *Trametes versicolor* és capaç de decolorar-los (Blánquez i col., 2004; Casas i col. 2007; Casas i col., submitted 2012). La degradació d'aquests colorants a mida que creix el fong és l'indicador de la viabilitat d'aquest. A la imatge 2 es mostren les plaques recent inoculades amb *Trametes versicolor* provinent del reactor 2.



Imatge 2. Inoculació de *T.versicolor* produït en el bioreactor 2 (temps 0). D'esquerra a dreta: Orange G, Methilene Blue i Gris Lanaset G



Orange G



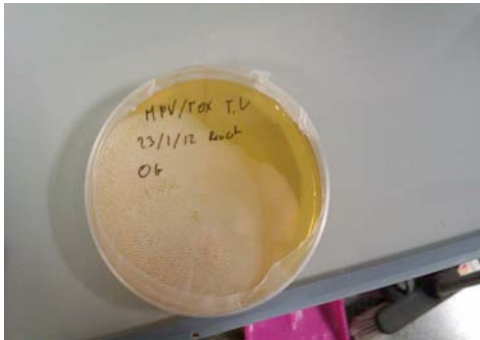
Methilene Blue



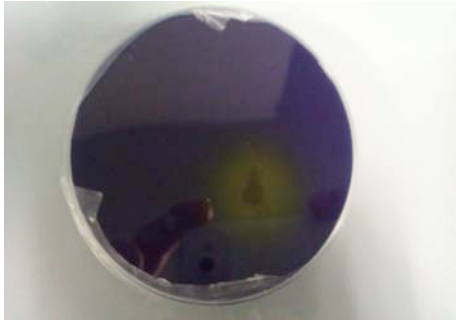
Gris lanaset G

Imatge 3. Creixement de *Trametes versicolor* al cap de 3 dies de ser inoculat a les plaques

A la imatge 3 es pot observar el miceli colonitzant el medi (temps = 3 dies), també s'observa molta transpiració per part del fong. Encara no s'aprecia cap símptoma de decoloració.



Orange G



Methylene blue



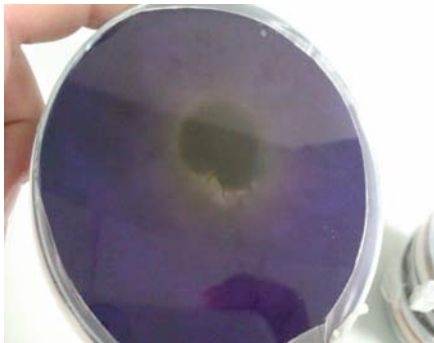
Gris Lanaset G

Imatge 4. Creixement de *Trametes versicolor* al cap de 6 dies de ser inoculat a les plaques

En la imatge 4 ja es pot observar com va augmentant l'àrea colonitzada pel fong. També es pot observar com aquesta colonització és major en la placa del colorant Orange G que en els altres dos, tot i així no es percep decoloració en cap colorant.



Orange G



Methylene blue



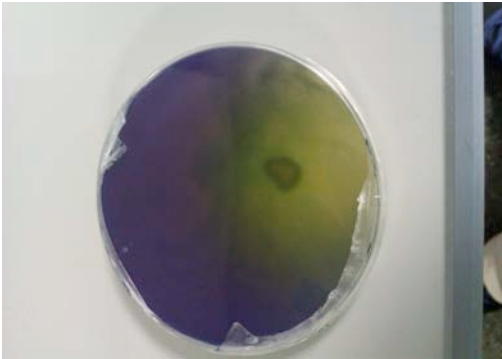
Gris Lanaset G

Imatge 5. Creixement de *Trametes versicolor* al cap de 16 dies de ser inoculat a les plaques

En la imatge 5 es mostra l'evolució del fong al cap de 16 dies de ser inoculat. En la placa amb Orange G el fong ja ocupa la totalitat de la placa, en canvi a les altres dues el fong li costa més créixer, tot i que en la placa de Methylene Blue es comença a apreciar la decoloració del medi.



Orange G



Methylene blue



Gris Lanaset G

Imatge 6. Creixement de *Trametes versicolor* al cap de 28 dies de ser inoculat a les plaques

En la imatge 6 es pot observar com el fong ja ocupa la totalitat de la placa d'Orange G i més de la meitat de la placa de Methylene Blue. En canvi el creixement en la placa de Gris lanaset es bastant pobre. Per altra banda també es pot veure la decoloració produïda per *T.versicolor* en Orange G i Methylene Blue.

4.2.2 Mesura del creixement de *T.versicolor*

A més de l'observació visual de creixement i decoloració també s'ha mesurat el diàmetre de creixement del fong sobre la placa. Els resultats obtinguts es presenten a la taula 4 i a les figures 4 5 i 6.

Taula 4. Creixement de *T.versicolor* en les plaques amb colorant.

dia	Orange G creixement de <i>T.versicolor</i> (cm)	Gris Lanaset G creixement <i>T.versicolor</i> (cm)	Methilene Blue creixement <i>T.versicolor</i> (cm)
dia 0	0	0	0
dia 3	3,5	2	1,5
dia 6	6,5	3	3
dia 16	9	3	4
dia 29	9	5,5	7

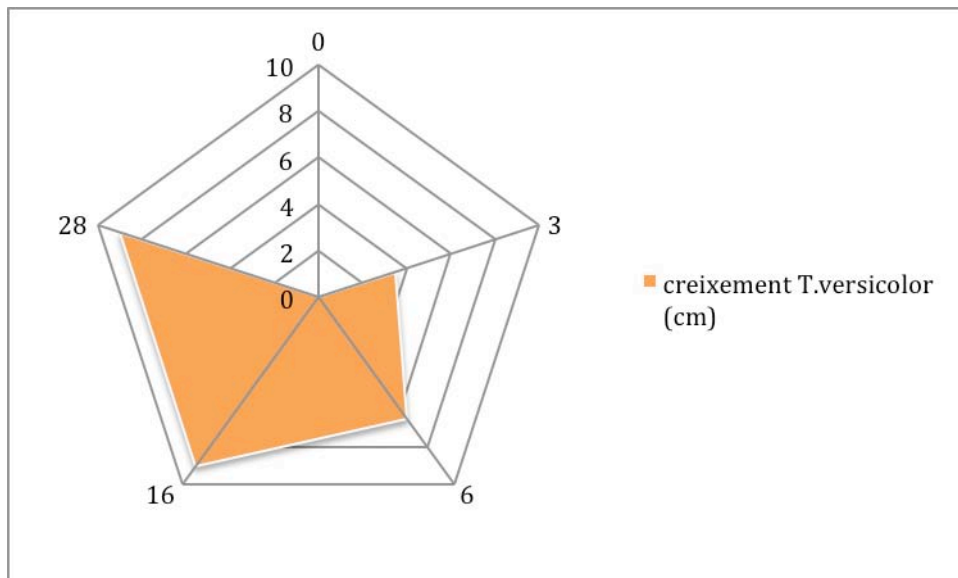


Figura 3. Creixement de *T.versicolor* en Orange G

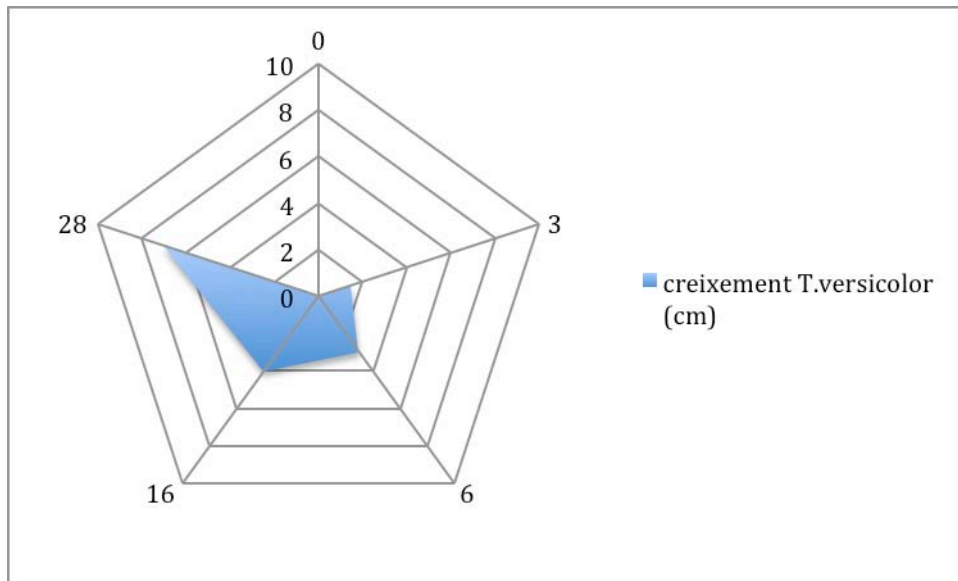


Figura 4. Creixement de *T.versicolor* en Methylene Blue

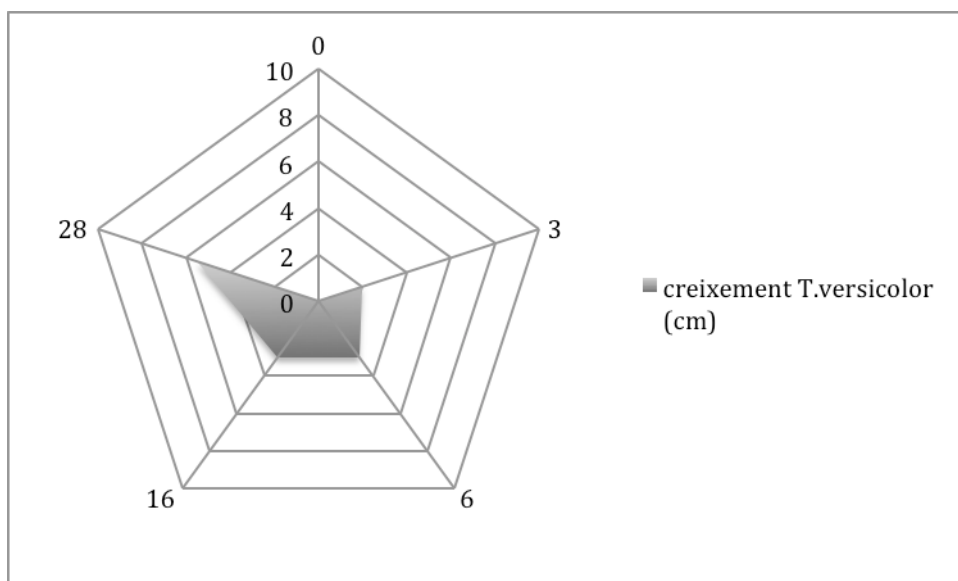
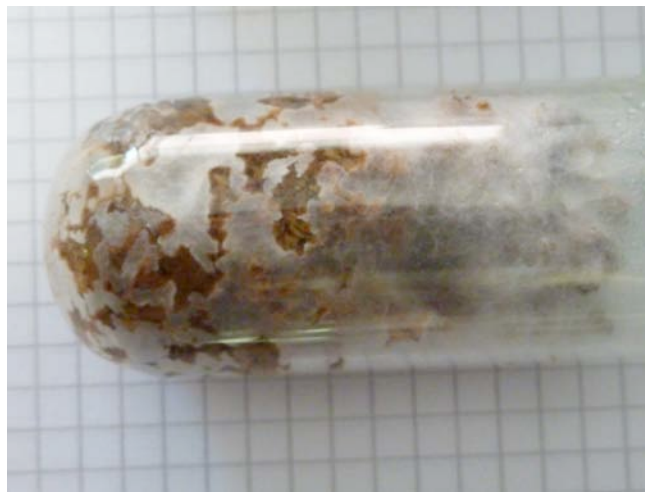


Figura 5. Creixement de *T.versicolor* en Gris Lanaset G

En tots els casos hi ha hagut creixement del fong sobre la placa i aquest està actiu tal com ho demostra la decoloració obtinguda. El creixement més lent s'observa pel colorant Gris Lanaset G lo qual pot indicar que és el colorant més difícil de biodegradar pel fong degut a la seva estructura organometàl·lica.

4.2.2 Proves de viabilitat en llots de depuradora

La biomassa obtinguda del bioreactor s'ha inoculat en dos substrats lignocel·lulòsics, branques d'olivera i pinso per a conills, que es poden utilitzar en una biopila amb una doble finalitat: com estructurant per donar porositat a la massa de residu, i al mateix temps com substrat per al fong. Per comprovar la colonització dels substrats s'ha observat el creixement del fong i s'ha mesurat l'enzim lacasa per comprovar que el fong és viable.



Imatge 7. Pinso per a conills colonitzat per *T.versicolor*



Imatge 8. Branques d'olivera triturades colonitzades per *T.versicolor*

En la imatge 7 es mostra la colonització del pinso per a conills per part del fong després de 10 dies d'incubació a 25°C. Tot i apreciar-se creixement del fong

sobre els substrats la producció de lacasa va ser molt minsa, tan per el substrat de pinso de conill com per a les branques d'olivera, tal i com mostra la taula 8.

Taula 5. Producció de lacasa per *T.versicolor* en diferents substrats lignocel·lulòsics

tub	Lacasa en pinso conill (U)	Lacasa en branques olivera (U)
1	0,066	0
2	0	0,13
3	0	1,509
4	0	0

Tot i que la producció de lacasa és baixa, l'observació visual mostra el creixement del fong i es procedeix amb aquests substrats colonitzats a inocular els llots d'EDAR. En la imatge 9 s'observa la barreja de llots d'EDAR i pinso per a conills colonitzat després de 15 dies, simulant un tractament en biopila.



Imatge 9. Llots de depuradora colonitzats per *T.versicolor*

En la taula 9 es mostra els resultats obtinguts de producció d'enzim lacasa en l'experiment en llots de depuradora. Tot i observar el creixement del fong dins dels tubs de pyrex, la producció de lacasa és mínima, però aquesta producció demostra que el fong està actiu.

Taula 6. Producció de lacasa per *T.versicolor* en la colonització de llots de depuradora

tub	Lacasa en llots + pinso de conill (U)	Lacasa en llots + branques d'olivera (U)
1	0,027	0
2	0	0,192
3	0,102	0,246
4	0,15	0

Conclusions

5. Conclusions

S'ha aconseguit produir biomassa del fong *Trametes Versicolor* en un reactor de tanc agitat partint d'un cultiu en placa.

El medi de cultiu utilitzat ha estat extracte de malta (20%) i el creixement aconseguit ha estat en forma de miceli dispers, per tant, s'ha aconseguit l'escalat de producció de miceli des de placa a reactor, evitant el pas intermedi de producció de miceli a escala erlenmeir, que és tal com es realitza fins al moment a escala laboratori.

S'ha comprovat la viabilitat de la biomassa produïda en el bioreactor per dos vies diferents, donant en els dos casos resultats satisfactoris.

- La decoloració en placa ha mostrat la viabilitat del fong produït i la seva capacitat de degradar colorants.
- La colonització de llots ha mostrat la viabilitat del fong sobre materials lignocelulosics i la capacitat de creixement en llots de depuradora.

Bibliografia

6. Bibliografia

APHA. (1995). "Standard methods for the examination of water and wastewater" 19th ed. American Publishers Health Association. Washington DC, USA.

Banci L, Ciofi BS, Tien M (1999) "Lignin and Mn peroxidase- catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers". Bio- chemistry 38:3205- 3210

Davis, M.W., i Lamar, R.T. (1992) *Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass*. Soil Biology & Biochemistry, Vol. 24, No. 3, pp.189-198.

Majcherczyk A., Johannes C., Hüttermann A. (1998) "Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) by Laccase of *Trametes versicolor*". Enzyme and Microbial Technology , 22, 335–341.

Rodríguez-Rodríguez C.E., Jelic A., Llorca M., Farré M., Caminal G., Petrovic M., Barceló D., Vicent T. (2011). "Solid-phase treatment with the fungus *Trametes versicolor* substantially reduces pharmaceutical concentrations and toxicity from sewage sludge" Bioresource Technology, 102, 5602–5608

Borràs E., Llorens G., Rodriguez-Rodriguez C.E., Sarrà M., Caminal G. (2011) Soil colonization by *Trametes versicolor* on lignocellulosic materials: Substrate selection and naproxen degradation.

Borràs E., Paqui B, Montserrat S, Glòria C, Tresa V. (2008) *Trametes versicolor* pellets producción: Low-cost médium and scale-up.

Borràs E. , Gloria Caminal, Montserrat Sarrà, Cenek Novotný (2010) Effect of soil bacteria on the ability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by *Trametes versicolor* and *Irpex lacteus* from contaminated soil

Marco-Urrea E., Pérez-Trujillo M., Carles Cruz-Morató, Gloria Caminal, Teresa Vicent

Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR

Journal of Hazardous Materials Volume 176, Issues 1–3, 15 April 2010, Pages 836–842

D. CULLEN and P.J. KERSTEN

Enzymology and Molecular Biology of Lignin Degradation Pag 295-306

The Mycota III Biochemistry and Molecular Biology, 2nd Edition R. Brambl and G.A. Marzluf (Eds.) © Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 2004

http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf2004/fpl_2004_cullen002.pdf

vist el 3/03/12

M Lorenzo, D Moldes, S Rodríguez Couto, A Sanromán. (2002) *Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of trametes versicolor.* Bioresource Technology, Vol. 82, pp. 109-113.

N. Casas, P. Blánquez, X. Gabarrell, T. Vicent, G. Caminal, M. Sarrà,

Título: "Degradation of Orange G by laccase: Fungal versus enzymatic process"

Ref. revista / Libro: **Environmental Technology**

Clau: A Volum: 28 Pàgines, inicial 1103 final: 1110 data: 2007

Nuria Casas, Paqui Blánquez, Glòria Caminal, Teresa Vicent, Montserrat Sarrà.

"The potential of *Trametes versicolor* and laccase enzyme for the efficient decolorization and detoxification of different types of recalcitrant dyes"

Ref. revista / Libro: **Int Biodeterioration and Biodegradation**

Clau: A Volum: Pàgines, inicial: final: Data: submitted 2012

Paszczyński A, Crawford RL, Huynh VB. 1988. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Method. Enzymol.* 161:264-270.

P. Blázquez, N. Casas, X. Gabarrell, M. Sarrà, G. Caminal, T. Vicent.

Título: "Mechanism of Textile Metal Dye Biotransformation by *Trametes versicolor* and rol of laccase"

Ref. revista / Libro: **Water Research.**

Clave: A Volumen: 38 Páginas, inicial: 2166 final: 2172 Fecha: 2004

Carlos E. Rodríguez-Rodríguez, Ernest Marco-Urrea, Gloria Caminal (2010)
Naproxen degradation test to monitor Trametes versicolor activity in solid-state bioremediation processes. *Journal of Hazardous Materials*

Singh, H. (2006) *Mycoremediation, Fungal Bioremediation.* Wiley, pp. 2-4, 16-20
Swamy J, Ramsay JA. 1999. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 24: 130-7.

Wallenstein, M.D., i Weintraub, M.N. (2008) *Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes.* *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 40, pp. 2098-2106.

Webster, J., i Weber, R. W. S., (2007) *Introduction to Fungi.* Cambridge University Press, third edition, pp. 499, 560-562

X R Zhao, Q Lin, P C Brookes. (2005) *Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass?.* *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 37, pp. 311-317.

Annex

Annex I

Fitxa de seguretat d'Orange G

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD

de acuerdo el Reglamento (CE) No. 1907/2006

Versión 4.1 Fecha de revisión 15.11.2011

Fecha de impresión 17.04.2012

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O LA MEZCLA Y DE LA SOCIEDAD O LA EMPRESA

1.1 Identificadores del producto

Nombre del producto : Anaranjado G

Referencia : O3756
 Marca : Sigma
 No. CAS : 1936-15-8

1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados

Usos identificados : Reactivos para laboratorio, Fabricación de sustancias

1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad

Compañía : Sigma-Aldrich Química SA
 Ronda de Poniente, 3
 Aptdo. Correos 278
 E-28760 TRES CANTOS -MADRID

Teléfono : +34 91 6619977
 Fax : +34 91 6619642
 E-mail de contacto : eurtechserv@sial.com

1.4 Teléfono de emergencia

Teléfono de Urgencia : 704100087

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla

No es una sustancia peligrosa según SGA.
 Esta sustancia no está clasificada como peligrosa según la Directiva 67/548/CEE.

2.2 Elementos de la etiqueta

El producto no necesita ser etiquetado de acuerdo con las directivas de la Comunidad Europea ó las respectivas leyes nacionales.

2.3 Otros Peligros - ninguno(a)

3. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

3.1 Sustancias

Sinónimos : 7-Hydroxy-8-phenylazo-1,3-naphthalenedisulfonic acid
 Wool Orange 2G
 1-Phenylazo-2-naphthol-6,8-disulfonic acid
 Acid Orange 10

Formula : $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$
 Peso molecular : 452,37 g/mol

4. PRIMEROS AUXILIOS

4.1 Descripción de los primeros auxilios

Si es inhalado

Si aspiró, mueva la persona al aire fresco. Si ha parado de respirar, hacer la respiración artificial.

En caso de contacto con la piel

Eliminar lavando con jabón y mucha agua.

En caso de contacto con los ojos

Lavarse abundantemente los ojos con agua como medida de precaución.

Si es tragado

Nunca debe administrarse nada por la boca a una persona inconsciente. Enjuague la boca con agua.

4.2 Principales síntomas y efectos, agudos y retardados

Según nuestras informaciones, creemos que no se han investigado adecuadamente las propiedades químicas, físicas y toxicológicas.

4.3 Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente

sin datos disponibles

5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS**5.1 Medios de extinción****Medios de extinción apropiados**

Usar agua pulverizada, espuma resistente al alcohol, polvo seco o dióxido de carbono.

5.2 Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla

Óxidos de carbono, óxidos de nitrógeno (NOx), Óxidos de azufre, Óxidos de sodio

5.3 Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios

Si es necesario, usar equipo de respiración autónomo para la lucha contra el fuego.

5.4 Otros datos

sin datos disponibles

6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL**6.1 Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia**

Evite la formación de polvo. Evitar respirar los vapores, la neblina o el gas.

6.2 Precauciones relativas al medio ambiente

No dejar que el producto entre en el sistema de alcantarillado.

6.3 Métodos y material de contención y de limpieza

Limpiar y traspalar. Guardar en contenedores apropiados y cerrados para su eliminación.

6.4 Referencia a otras secciones

Para eliminación de desechos ver sección 13.

7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO**7.1 Precauciones para una manipulación segura**

Debe disponer de extracción adecuada en aquellos lugares en los que se forma polvo. Disposiciones normales de protección preventivas de incendio.

7.2 Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades

Almacenar en un lugar fresco. Conservar el envase herméticamente cerrado en un lugar seco y bien ventilado.

7.3 Usos específicos finales

sin datos disponibles

8. CONTROLES DE EXPOSICIÓN/ PROTECCIÓN INDIVIDUAL**8.1 Parámetros de control****Componentes con valores límite ambientales de exposición profesional.**

No contiene sustancias con valores límites de exposición profesional.

8.2 Controles de la exposició

Controles tècnics apropiados

Procedimiento general de higiene industrial.

Protección personal

Protección de los ojos/ la cara

Use equipo de protección para los ojos probado y aprobado según las normas gubernamentales correspondientes, tales como NIOSH (EE.UU.) o EN 166 (UE).

Protección de la piel

Manipular con guantes. Los guantes deben ser controlados antes de la utilización. Utilice la técnica correcta de quitarse los guantes (sin tocar la superficie exterior del guante) para evitar el contacto de la piel con este producto. Deseche los guantes contaminados después de su uso, de conformidad con las leyes aplicables y buenas prácticas de laboratorio. Lavar y secar las manos.

Los guantes de protección seleccionados deben de cumplir con las especificaciones de la Directiva de la UE 89/686/CEE y de la norma EN 374 derivado de ello.

Protección Corporal

Elegir la protección para el cuerpo según sus características, la concentración y la cantidad de sustancias peligrosas, y el lugar específico de trabajo. El tipo de equipamiento de protección debe ser elegido según la concentración y la cantidad de sustancia peligrosa al lugar específico de trabajo.

Protección respiratoria

Protección respiratoria no requerida. Donde la protección sea deseada Usar respiradores y componentes testados y aprobados bajo los estándares gubernamentales apropiados como NIOSH (EEUU) o CEN (UE)

9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

9.1 Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

a) Aspecto	Estado físico: sólido
b) Olor	sin datos disponibles
c) Umbral olfativo	sin datos disponibles
d) pH	sin datos disponibles
e) Punto de fusión/ punto de congelación	sin datos disponibles
f) Punto inicial de ebullición e intervalo de ebullición	sin datos disponibles
g) Punto de inflamación	sin datos disponibles
h) Tasa de evaporación	sin datos disponibles
i) Inflamabilidad (sólido, gas)	sin datos disponibles
j) Inflamabilidad superior/inferior o límites explosivos	sin datos disponibles
k) Presión de vapor	sin datos disponibles
l) Densidad de vapor	sin datos disponibles
m) Densidad relativa	sin datos disponibles
n) Solubilidad en agua	sin datos disponibles
o) Coeficiente de reparto n-octanol/agua	sin datos disponibles
p) Temperatura de auto-	sin datos disponibles

inflamación

- | | | |
|----|-------------------------------|-----------------------|
| q) | Temperatura de descomposición | sin datos disponibles |
| r) | Viscosidad | sin datos disponibles |
| s) | Propiedades explosivas | sin datos disponibles |
| t) | Propiedades comburentes | sin datos disponibles |

9.2 Otra información de seguridad
sin datos disponibles

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

10.1 Reactividad
sin datos disponibles

10.2 Estabilidad química
sin datos disponibles

10.3 Posibilidad de reacciones peligrosas
sin datos disponibles

10.4 Condiciones que deben evitarse
sin datos disponibles

10.5 Materiales incompatibles
Agentes oxidantes fuertes

10.6 Productos de descomposición peligrosos
Otros productos de descomposición peligrosos - sin datos disponibles

11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

11.1 Información sobre los efectos tóxicos

Toxicidad aguda
sin datos disponibles

Corrosión o irritación cutáneas
sin datos disponibles

Lesiones o irritación ocular graves
sin datos disponibles

Sensibilización respiratoria o cutánea
sin datos disponibles

Mutagenicidad en células germinales

Genotoxicidad in vitro - ratón - linfocito

Genotoxicidad in vitro - Hamster - ovario
análisis citogenéticos

Carcinogenicidad

Este producto es o contiene un componente no clasificable con respecto a su carcinogenicidad en humanos, basado en su clasificación por IARC (International Agency for Research on Cancer; Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer), ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists; Conferencia de Higienistas Industriales Gubernamentales de los Estados Unidos), NTP (National Toxicology Program; Programa Nacional de Toxicología) de los Estados Unidos o EPA (Environmental Protection Agency; Agencia para la Protección del Medio Ambiente) de los Estados Unidos.

IARC: 3 - Grupo 3: No clasificable como carcinógeno para los humanos (Disodium 7-hydroxy-8-phenylazonaphthalene-1,3-disulphonate)

Toxicidad para la reproducción

Toxicidad para la reproducción - Cerdo - Oral

Efectos sobre el Aparato Reprodutor: Testículos, epidídimo y espermiducto

Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única

sin datos disponibles

Toxicidad específica en determinados órganos - exposiciones repetidas

sin datos disponibles

Peligro de aspiración

sin datos disponibles

Efectos potenciales sobre la salud**Inhalación**

Puede ser nocivo si se inhala. Puede provocar una irritación en el tracto respiratorio.

Ingestión

Puede ser nocivo si es tragado.

Piel

Puede ser nocivo si es absorbido por la piel. Puede provocar una irritación de la piel.

Ojos

Puede provocar una irritación en los ojos.

Signos y Síntomas de la Exposición

Según nuestras informaciones, creemos que no se han investigado adecuadamente las propiedades químicas, físicas y toxicológicas.

Información Adicional

RTECS: QJ6500000

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA**12.1 Toxicidad**

sin datos disponibles

12.2 Persistencia y degradabilidad

sin datos disponibles

12.3 Potencial de bioacumulación

sin datos disponibles

12.4 Movilidad en el suelo

sin datos disponibles

12.5 Resultados de la valoración PBT y mPmB

sin datos disponibles

12.6 Otros efectos adversos

sin datos disponibles

13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN**13.1 Métodos para el tratamiento de residuos****Producto**

Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada.

Envases contaminados

Eliminar como producto no usado.

14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE**14.1 Número ONU**

ADR/RID: -

IMDG: -

IATA: -

14.2 Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas

ADR/RID: Mercancía no peligrosa

IMDG: Not dangerous goods

IATA: Not dangerous goods

14.3 Clase(s) de peligro para el transporte

ADR/RID: -

IMDG: -

IATA: -

14.4 Grupo embalaje

ADR/RID: -

IMDG: -

IATA: -

14.5 Peligros para el medio ambiente

ADR/RID: no

IMDG Marine pollutant: no

IATA: no

14.6 Precauciones particulares para los usuarios

sin datos disponibles

15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA

La hoja técnica de seguridad cumple con los requisitos de la Reglamento (CE) No. 1907/2006.

15.1 Reglamentación y legislación en materia de seguridad, salud y medio ambiente específicas para la sustancia o la mezcla

sin datos disponibles

15.2 Evaluación de la seguridad química

sin datos disponibles

16. OTRA INFORMACIÓN**Otros datos**

Copyright 2011 Sigma-Aldrich. Se autoriza la reproducción en número ilimitado de copias para uso exclusivamente interno.

La información indicada arriba se considera correcta pero no pretende ser exhaustiva y deberá utilizarse únicamente como orientación. Sigma-Aldrich, no responderá por ningún daño resultante de la manipulación o contacto con el producto indicado arriba. Ver otros términos y condiciones de venta en el reverso de la factura o de la nota de entrega.

Fitxa de seguretat Mthilene Blue

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD

de acuerdo el Reglamento (CE) No. 1907/2006

Versión 4.1 Fecha de revisión 30.03.2012

Fecha de impresión 17.04.2012

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O LA MEZCLA Y DE LA SOCIEDAD O LA EMPRESA**1.1 Identificadores del producto**

Nombre del producto : Methylene blue

Referencia : M9140

Marca : Sigma-Aldrich

No. CAS : 7220-79-3

1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados

Usos identificados : Reactivos para laboratorio, Fabricación de sustancias

1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad

Compañía : Sigma-Aldrich Química SA
 Ronda de Poniente, 3
 Aptdo. Correos 278
 E-28760 TRES CANTOS -MADRID

Teléfono : +34 91 6619977

Fax : +34 91 6619642

E-mail de contacto : eurtechserv@sial.com

1.4 Teléfono de emergencia

Teléfono de Urgencia : 704100087

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS**2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla****Clasificación de acuerdo con el Reglamento (CE) 1272/2008 [UE-GHS/CLP]**

Toxicidad aguda, Oral (Categoría 4)

Irritación cutáneas (Categoría 2)

Irritación ocular (Categoría 2)

Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única (Categoría 3)

Clasificación de acuerdo con las Directivas de la UE 67/548/CEE ó 1999/45/CE

Nocivo por ingestión. Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias.

2.2 Elementos de la etiqueta**Etiquetado de acuerdo con el Reglamento (CE) 1272/2008 [UE-GHS/CLP]**

Pictograma



Palabra de advertencia : Atención

Indicación(es) de peligro

H302

Nocivo en caso de ingestión.

H315

Provoca irritación cutánea.

H319

Provoca irritación ocular grave.

H335

Puede irritar las vías respiratorias.

Declaración(es) de prudencia

P261

Evitar respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol.

P305 + P351 + P338

EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el

lavado.

Declaración Suplementaria del Peligro ninguno(a)

Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad.

De acuerdo con la Directiva Europea 67/548/CEE, y sus enmiendas.

Símbolo(s) de peligrosidad



Frase(s) - R

R22

Nocivo por ingestión.

R36/37/38

Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias.

Frase(s) - S

S26

En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

S36

Úsele indumentaria protectora adecuada.

2.3 Otros Peligros - ninguno(a)**3. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES****3.1 Sustancias**

Sinónimos

: Tetramethylthionine chloride
 3,7-bis(Dimethylamino)phenazathionium chloride
 Basic Blue 9

Formula

: $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$

Peso molecular

: 373,90 g/mol

Componente		Concentración
Methylthioninium chloride		
No. CAS	7220-79-3	-
No. CE	200-515-2	

4. PRIMEROS AUXILIOS**4.1 Descripción de los primeros auxilios****Recomendaciones generales**

Consultar a un médico. Mostrar esta ficha de seguridad al doctor que esté de servicio.

Si es inhalado

Si aspiró, mueva la persona al aire fresco. Si ha parado de respirar, hacer la respiración artificial.

Consultar a un médico.

En caso de contacto con la piel

Eliminar lavando con jabón y mucha agua. Consultar a un médico.

En caso de contacto con los ojos

Lávese a fondo con agua abundante durante 15 minutos por lo menos y consulte al médico.

Si es tragado

Nunca debe administrarse nada por la boca a una persona inconsciente. Enjuague la boca con agua.

Consultar a un médico.

4.2 Principales síntomas y efectos, agudos y retardados

En caso de absorción por el cuerpo, da lugar a la formación de metahemoglobina que, en concentración suficiente, provoca cianosis. El ataque puede tardar de 2 a 4 horas, o más, en manifestarse., Vómitos, Diarrea, Según nuestras informaciones, creemos que no se han investigado adecuadamente las propiedades químicas, físicas y toxicológicas.

- 4.3 Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente**
sin datos disponibles

5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS

5.1 Medios de extinción

Medios de extinción apropiados

Usar agua pulverizada, espuma resistente al alcohol, polvo seco o dióxido de carbono.

5.2 Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla

Óxidos de carbono, óxidos de nitrógeno (NO_x), Óxidos de azufre, Gas cloruro de hidrógeno

5.3 Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios

Si es necesario, usar equipo de respiración autónomo para la lucha contra el fuego.

5.4 Otros datos

sin datos disponibles

6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

6.1 Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia

Utilícese equipo de protección individual. Evite la formación de polvo. Evitar respirar los vapores, la neblina o el gas. Asegúrese una ventilación apropiada. Evacuar el personal a zonas seguras. Evitar respirar el polvo.

6.2 Precauciones relativas al medio ambiente

No dejar que el producto entre en el sistema de alcantarillado.

6.3 Métodos y material de contención y de limpieza

Recoger y preparar la eliminación sin originar polvo. Limpiar y traspalar. Guardar en contenedores apropiados y cerrados para su eliminación.

6.4 Referencia a otras secciones

Para eliminación de desechos ver sección 13.

7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

7.1 Precauciones para una manipulación segura

Evítese el contacto con los ojos y la piel. Evítese la formación de polvo y aerosoles. Debe disponer de extracción adecuada en aquellos lugares en los que se forma polvo. Disposiciones normales de protección preventivas de incendio.

7.2 Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades

Almacenar en un lugar fresco. Conservar el envase herméticamente cerrado en un lugar seco y bien ventilado.

7.3 Usos específicos finales

sin datos disponibles

8. CONTROLES DE EXPOSICIÓN/ PROTECCIÓN INDIVIDUAL

8.1 Parámetros de control

Componentes con valores límite ambientales de exposición profesional.

No contiene sustancias con valores límites de exposición profesional.

8.2 Controles de la exposición

Controles técnicos apropiados

Manipular con las precauciones de higiene industrial adecuadas, y respetar las prácticas de seguridad. Lávense las manos antes de los descansos y después de terminar la jornada laboral.

Protección personal**Protección de los ojos/ la cara**

Gafas de seguridad con protecciones laterales conformes con la EN166 Use equipo de protección para los ojos probado y aprobado según las normas gubernamentales correspondientes, tales como NIOSH (EE.UU.) o EN 166 (UE).

Protección de la piel

Manipular con guantes. Los guantes deben ser controlados antes de la utilización. Utilice la técnica correcta de quitarse los guantes (sin tocar la superficie exterior del guante) para evitar el contacto de la piel con este producto. Deseche los guantes contaminados después de su uso, de conformidad con las leyes aplicables y buenas prácticas de laboratorio. Lavar y secar las manos.

Los guantes de protección seleccionados deben de cumplir con las especificaciones de la Directiva de la UE 89/686/CEE y de la norma EN 374 derivado de ello.

Protección Corporal

Traje de protección completo contra productos químicos, El tipo de equipamiento de protección debe ser elegido según la concentración y la cantidad de sustancia peligrosa al lugar específico de trabajo.

Protección respiratoria

Para exposiciones molestas use respirador de partículas tipo P95 (EE.UU.) o tipo P1 (UE EN 143). Para un nivel de protección mayor use cartuchos de respirador tipo OV/AG/P99 (EE.UU.) o ABEK-P2 (UE EN 143). Usar respiradores y componetes testados y aprobados bajo los estandards gubernamentales apropiados como NIOSH (EEUU) o CEN (UE)

9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS**9.1 Información sobre propiedades físicas y químicas básicas**

a) Aspecto	Forma: polvo Color: verde oscuro
b) Olor	sin datos disponibles
c) Umbral olfativo	sin datos disponibles
d) pH	sin datos disponibles
e) Punto de fusión/ punto de congelación	Punto/intervalo de fusión: 190 °C
f) Punto inicial de ebullición e intervalo de ebullición	sin datos disponibles
g) Punto de inflamación	sin datos disponibles
h) Tasa de evaporación	sin datos disponibles
i) Inflamabilidad (sólido, gas)	sin datos disponibles
j) Inflamabilidad superior/inferior o límites explosivos	sin datos disponibles
k) Presión de vapor	sin datos disponibles
l) Densidad de vapor	sin datos disponibles
m) Densidad relativa	sin datos disponibles
n) Solubilidad en agua	soluble
o) Coeficiente de reparto n-octanol/agua	sin datos disponibles
p) Temperatura de auto-inflamación	sin datos disponibles
q) Temperatura de	sin datos disponibles

descomposició

- r) Viscosidad sin datos disponibles
- s) Propiedades explosivas sin datos disponibles
- t) Propiedades comburentes sin datos disponibles

9.2 Otra información de seguridad

sin datos disponibles

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

10.1 Reactividad

sin datos disponibles

10.2 Estabilidad química

sin datos disponibles

10.3 Posibilidad de reacciones peligrosas

sin datos disponibles

10.4 Condiciones que deben evitarse

sin datos disponibles

10.5 Materiales incompatibles

Agentes oxidantes fuertes

10.6 Productos de descomposición peligrosos

Otros productos de descomposición peligrosos - sin datos disponibles

11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

11.1 Información sobre los efectos toxicológicos

Toxicidad aguda

sin datos disponibles

Corrosión o irritación cutáneas

sin datos disponibles

Lesiones o irritación ocular graves

sin datos disponibles

Sensibilización respiratoria o cutánea

sin datos disponibles

Mutagenicidad en células germinales

sin datos disponibles

Carcinogenicidad

IARC: No se identifica ningún componente de este producto, que presente niveles mayores que o igual a 0,1% como agente carcinógeno humano probable, posible o confirmado por la (IARC) Agencia Internacional de Investigaciones sobre Carcinógenos.

Toxicidad para la reproducción

sin datos disponibles

Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única

Inhalación - Puede irritar las vías respiratorias.

Toxicidad específica en determinados órganos - exposiciones repetidas

sin datos disponibles

Peligro de aspiración

sin datos disponibles

Efectos potenciales sobre la salud

Inhalación

Puede ser nocivo si se inhala. Provoca una irritación del tracto respiratorio.

Ingestión	Nocivo por ingestión.
Piel	Puede ser nocivo si es absorbido por la piel. Provoca irritaciones de la piel.
Ojos	Provoca irritación ocular grave.

Signos y Síntomas de la Exposición

En caso de absorción por el cuerpo, da lugar a la formación de metahemoglobina que, en concentración suficiente, provoca cianosis. El ataque puede tardar de 2 a 4 horas, o más, en manifestarse., Vómitos, Diarrea, Según nuestras informaciones, creemos que no se han investigado adecuadamente las propiedades químicas, físicas y toxicológicas.

Información Adicional

RTECS: SP5740000

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA**12.1 Toxicidad**

sin datos disponibles

12.2 Persistencia y degradabilidad

sin datos disponibles

12.3 Potencial de bioacumulación

sin datos disponibles

12.4 Movilidad en el suelo

sin datos disponibles

12.5 Resultados de la valoración PBT y mPmB

sin datos disponibles

12.6 Otros efectos adversos

sin datos disponibles

13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN**13.1 Métodos para el tratamiento de residuos****Producto**

Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Para la eliminación de este producto, dirigirse a un servicio profesional autorizado. Disolver o mezclar el producto con un solvente combustible y quemarlo en un incinerador apto para productos químicos provisto de postquemador y lavador.

Envases contaminados

Eliminar como producto no usado.

14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE**14.1 Número ONU**

ADR/RID: -

IMDG: -

IATA: -

14.2 Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas

ADR/RID: Mercancía no peligrosa

IMDG: Not dangerous goods

IATA: Not dangerous goods

14.3 Clase(s) de peligro para el transporte

ADR/RID: -

IMDG: -

IATA: -

14.4 Grupo embalaje

ADR/RID: -

IMDG: -

IATA: -

14.5 Peligros para el medio ambiente

ADR/RID: no

IMDG Marine pollutant: no

IATA: no

14.6 Precauciones particulares para los usuarios

sin datos disponibles

15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA

La hoja técnica de seguridad cumple con los requisitos de la Reglamento (CE) No. 1907/2006.

15.1 Reglamentación y legislación en materia de seguridad, salud y medio ambiente específicas para la sustancia o la mezcla

sin datos disponibles

15.2 Evaluación de la seguridad química

sin datos disponibles

16. OTRA INFORMACIÓN**Otros datos**

Copyright 2012 Sigma-Aldrich Co. LLC. Se autoriza la reproducción en número ilimitado de copias para uso exclusivamente interno.

La información indicada arriba se considera correcta pero no pretende ser exhaustiva y deberá utilizarse únicamente como orientación. La información contenida en este documento esta basada en el presente estado de nuestro conocimiento y es aplicable a las precauciones de seguridad apropiadas para el producto. No representa ninguna garantía de las propiedades del producto. La Corporación Sigma-Aldrich y sus Compañías Afiliadas, no responderán por ningún daño resultante de la manipulación o contacto con el producto indicado arriba. Dirijase a www.sigma-aldrich.com y/o a los términos y condiciones de venta en el reverso de la factura o de la nota de entrega.

Fitxa seguretat de Gris lanaset G

Ciba Specialty Chemicals Corporation

**Material Safety Data Sheet**

OSHA / ANSI Z400.1-2004 Compliant

MSDS date: 19-Aug-2005

NFPA Rating: Health: 2 Flammability: 1 Instability: 0
HMIS Rating: Health: 2 Flammability: 1 Physical Hazard: 0 Personal Protection: X

1. PRODUCT AND COMPANY IDENTIFICATION

Product Name: LANASET GREY SI HS-5600
Product Number: 0379214
Chemical Family: Azo Metal Complex Dye
Intended Use: Printing inks
Manufacturer/Supplier: Ciba Specialty Chemicals Corporation
4050 Premier Drive
HighPoint, NC 27265
8:30am - 5pm Phone Number: 1-336-801-2500
MSDS Request Line (voicemail): 1-800-431-2360
Customer Service/Product Information 1-800-334-8124
Emergency 24-Hour Health/Environmental Phone: 1-800-873-1138

2. HAZARDS IDENTIFICATION**EMERGENCY OVERVIEW**

Signal Word: WARNING!
Physical Form: Liquid
Color: Black
Odor: Characteristic
Health: May cause sensitization by skin contact. This product may cause eye, skin irritation nasal passage, throat and respiratory tract irritation. Avoid contact..
Physical Hazards: None known.

OSHA Hazardous Substance: This material is classified as hazardous under OSHA regulations.
Primary Route(s) of Entry: Ingestion, Skin, Inhalation, Eyes.

MSDS date: 19-Aug-2005

Product Name: LANASET GREY SI HS-5600

3. COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

HAZARDOUS COMPONENTS

Components	CAS Number	Weight %
E-Caprolactam	105-60-2	10
Erionyl Black M-RN a.i. (Chromium Compound)	57693-14-8	9.59

4. FIRST AID MEASURES

Eyes:	Immediately flush the eye(s) with lukewarm, gently flowing water for 15 minutes or until the chemical is removed. Get immediate medical attention if irritation persists.
Skin:	If clothing is contaminated, remove and launder before reuse. Wash off immediately with soap and plenty of water. Get medical attention if irritation occurs.
Inhalation:	Remove to fresh air, if not breathing give artificial respiration. If breathing is difficult, give oxygen and get immediate medical attention.
Ingestion:	Do not induce vomiting. If vomiting occurs naturally, have casualty lean forward to reduce the risk of aspiration. Seek medical attention immediately.

5. FIRE FIGHTING MEASURES

Fire Fighting Measures:	Standard procedure for chemical fires.
Suitable Extinguishing Media:	Carbon dioxide, dry chemical or foam.
Fire Fighting Equipment:	Wear self-contained breathing apparatus and protective suit.
Hazardous Combustion Products:	Burning may produce toxic combustion products.

6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

Cleanup Instructions:	Absorb spill with inert material (e.g. dry sand or earth), then place in a chemical waste container. Wear suitable protective equipment. Should not be released into the environment.
------------------------------	---

7. HANDLING AND STORAGE

Handling:	As with all industrial chemicals, use good industrial practices when handling. Avoid eye, skin, and clothing contact. Do not inhale. Do not taste or swallow. Use only with adequate ventilation.
Storage:	Keep containers tightly closed in a cool, well-ventilated place.

For Industrial Use Only

8. EXPOSURE CONTROLS / PERSONAL PROTECTION

Exposure Guidelines:

MSDS date: 19-Aug-2005

Product Name: LANASET GREY SI HS-5600

Components	OSHA PEL	OSHA STEL	ACGIH TWA	ACGIH STEL	Ciba/ Manufacturer IEL:
E-Caprolactam 105-60-2		3 mg/m ³ 40 mg/m ³ 10 ppm	5 mg/m ³		

Personal Protective Equipment

Eye/Face Protection: Wear splash proof chemical goggles.

Skin Protection: Wear chemical resistant gloves and protective clothing.

Respiratory Protection: Use NIOSH approved respirator as needed to mitigate exposure.

Engineering Controls: Work in well ventilated areas. Do not breathe vapors or mist.

9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Physical Form: Liquid

Color: Black

Odor: Characteristic.

Boiling Point: > 100°C (212°F)

Freezing/Melting Point: Not determined

Solubility in water: Miscible

Vapor Density: Not determined

Vapor Pressure: Not determined

Density: ~1.1 g/cm³ @ 20°C

Specific Gravity: Not determined

pH: 6 - 8 @ 20 g/L

Percent Volatile: Not determined

VOC: ~30% (Estimated, based on component wt. %)

Partition Coefficient (Octanol/Water): Not determined

Autoignition Temperature: Not determined

Decomposition Temperature: Not determined

Flammability Limits in Air:

Flash point: > 100°C (212°F)

Test Method (for Flash Point): Not determined

10. STABILITY AND REACTIVITY

Stability: Stable.

Conditions to Avoid: None known

Incompatibility: Strong oxidizing agents, strong acids, strong bases.

Hazardous Decomposition Products: No decomposition expected under normal storage conditions.

Possibility of Hazardous Reactions: None expected.

11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

Acute Oral Toxicity: (Rats) LD50 > 2000 mg/kg *

MSDS date: 19-Aug-2005

Product Name: LANASET GREY SI HS-5600

Acute Dermal Toxicity:	Not determined
Acute Inhalation Toxicity:	May cause respiratory irritation.
Eye Irritation:	(Rabbits) irritant*
Skin Irritation:	(Rabbits) irritant*
Skin Sensitization:	(Guinea Pig) Sensitizer *
Carcinogenicity (IARC; NTP; OSHA; ACGIH):	None of the components in this product at concentrations greater than 0.1% are listed by IARC; NTP, OSHA or ACGIH as a carcinogen.
Mutagenicity:	Not determined
Reproductive Toxicity:	Not determined
Teratogenicity:	Not determined
Neurotoxicity:	Not determined
Subacute Toxicity:	Not determined
Subchronic Toxicity:	Not determined
Chronic toxicity:	Not determined
Absorption / Distribution / Excretion / Metabolism:	Not determined
Additional Information:	*Note: The above data based on component information.

12. ECOLOGICAL INFORMATION

Toxicity to Fish:	(Zebra fish) LC50 > 100 mg/L 96 hour *
Toxicity to Invertebrates:	EC50 > 100 mg/L 48 hour *
Toxicity to Algae:	Not determined
Toxicity to Sewage Bacteria:	IC50 > 300 mg/L 3 hour *
Activated Sludge Respiration Inhibition Test:	Not determined
Biochemical Oxygen Demand (BOD):	0 mg/g *
Chemical Oxygen Demand (COD):	618 mg/g *
Total Oxygen Demand (TOD):	Not determined

MSDS date: 19-Aug-2005

Product Name: LANASET GREY SI HS-5600

Biodegradability: Bioelimination: 50 -60% *

Bioaccumulation: Not determined

Additional Environmental Data: *Note: The above data based on known component information.

13. DISPOSAL CONSIDERATIONS

Waste Disposal: Dispose in accordance with local, state, provincial and federal regulations.

14. TRANSPORT INFORMATION

U.S. Department of Transportation (DOT):

Not regulated for this mode of transport.

International Maritime Dangerous Goods (IMDG):

Not regulated for this mode of transport.

International Air Transportation Authority (IATA):

Not regulated for this mode of transport.

15. REGULATORY INFORMATION

Federal Regulations

OSHA Hazardous Substance: This material is classified as hazardous under OSHA regulations

Clean Air Act - Hazardous Air Pollutants (HAP): This product contains the following Hazardous Air Pollutants (HAP), as defined by the U.S. Clean Air Act Section 112 (40 CFR 61).

Components	CAA Section 112 Statutory Hazardous Air Pollutants
Erionyl Black M-RN a.i. (Chromium Compound) 57693-14-8 (3.03 %)	Listed.

Clean Air Act - Volatile Organic Compounds (VOC): This product contains the following SOCMI Intermediate or Final Volatile Organic Compounds (VOC), as defined by the U.S. Clean Air Act Section 111 (40 CFR 60.489). Refer to VOC data in section 9.

MSDS date: 19-Aug-2005

Product Name: LANASET GREY SI HS-5600

Components	CAA Section 111 Volatile Organic Compounds
E-Caprolactam 105-60-2	Listed.
1,2-Propanediol 57-55-6	Listed.

Clean Air Act - Ozone Depleting Substances (ODS): This product neither contains, nor was manufactured with, a Class I or Class II ozone depleting substance (ODS), as defined by the U.S. Clean Air Act Section 602 (40 CFR 82, Subpt. A, App. A+B).

Clean Water Act - Priority Pollutants (PP): This product contains the following priority pollutants listed under the U.S. Clean Water Act Section 307 (2)(1) Priority Pollutant List (40 CFR 401.15):

Components	CWA Section 307(2)(1) Priority Pollutants
Erionyl Black M-RN a.i. (Chromium Compound) 57693-14-8	Listed.

Resource Conservation and Recovery Act (RCRA): This product is considered a hazardous waste under RCRA (40 CFR 261.21). This product meets the D007 (characteristic toxicity) criteria.

SARA Section 302 Extremely Hazardous Substances (EHS): This product does not contain any components regulated under Section 302 (40 CFR 355) as Extremely Hazardous Substances.

SARA Section 304 CERCLA Hazardous Substances: This product contains the following component(s) regulated under Section 304 (40 CFR 302) as hazardous chemicals for emergency release notification ("CERCLA" List).

Components	Section 304 CERCLA Hazardous Substances	CERCLA Reportable Quantity
Erionyl Black M-RN a.i. (Chromium Compound) 57693-14-8 (3.03 %)	Listed.	NO RQ ASSIGNED.

SARA Section 311/312 Hazard Communication Standard (HCS): This product is regulated under Section 311/312 HCS (40 CFR 370). It's hazard(s): Acute (immediate) health hazard.

SARA Section 313 Toxic Chemical List (TCL): The following component(s) are listed on the Section 313 Toxic Chemical List: (Cr = 0.16%)

Components	Weight %	Section 313 Status
Erionyl Black M-RN a.i. (Chromium Compound) 57693-14-8	3.03	Listed.

TSCA Section 8(b) Inventory Status: All component(s) comprising this product are either exempt or listed on the TSCA inventory.

TSCA Section 5(e) Consent Orders: This product is not subject to a Section 5(e) Consent Order.

TSCA Significant New Use Rule (SNUR): This product is not subject to a Significant New Use Rule (SNUR).

TSCA Section 5(f): This product is not subject to a Section 5(f)/6(a) rule.

TSCA Section 12(b) Export Notification: This product does not contain any component(s) that are subject to a Section 12(b) Export Notification

MSDS date: 19-Aug-2005

Product Name: LANASET GREY SI HS-5600

State Regulations

California Proposition 65: This product does not contain any components currently on the California list of Known Carcinogens and Reproductive Toxins.

Pennsylvania Right-To-Know: This product contains the following component(s) which are subject to Pennsylvania Right-to-Know disclosure requirement.

Components	CAS Number	Pennsylvania Right-to-Know
E-Caprolactam	105-60-2	Listed.
1,2-Propanediol	57-55-6	Listed.
Erionyl Black M-RN a.i. (Chromium Compound)	57693-14-8	Listed.

International Regulations

Chemical Weapons Convention (CWC): This product does not contain any component(s) listed under the Chemical Weapons Convention Schedule of Chemicals.

16. OTHER INFORMATION

Reason for revision: Section(s) revised: 15

Disclaimer: The information contained herein is based upon data believed to be correct. However, no guarantee or warranty of any kind, expressed or implied, is made with respect to such data or information. The user is responsible for determining whether the product is suitable for its intended conditions of use.